

131.08.90



8

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT CONFÉDÉRATION SUISSE CONFEDERAZIONE SVIZZERA

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen überein mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein. *

Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein * spécifiée à la page suivante.

Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein * specificata nella pagina seguente.

Bern, 15. Juni 1990

Bundesamt für geistiges Eigentum
Office fédéral de la propriété intellectuelle
Ufficio federale della proprietà intellettuale

Der Sektionschef / Le chef de section / Il capo di sezione

Grünig

* Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

* La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux États.

* La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

This Page Blank (uspto)

N 31.08.90

Voraussichtliche Klasse(n): C07K/A61K

Patentgesuch Nr. 03 319/89-6

Patent- F. Hoffmann-La Roche AG
bewerber: 4002 Basel
Postfach
Schweiz

12-09-89

Titel: TNF-bindende Proteine.

Datum der
Anmeldung: 12.09.89

Priorität: -

Referenz: RAN 4105/125

This Page Blank (uspto)

11.31.08.90

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel/Schweiz

RAN 4105/125

5

10

TNF-bindende Proteine

15 Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α , auch Cachectin), auf
Grund seiner haemorrhagisch-nekrotisierenden Wirkung auf
bestimmte Tumoren entdeckt, und Lymphotoxin (TNF β) sind zwei
nah verwandte Peptidfaktoren [3] aus der Klasse der
Lymphokine/Cytokine, die im folgenden beide als TNF
20 bezeichnet werden [siehe Uebersichtsarbeiten 2 und 3]. TNF
verfügt über ein breites zelluläres Wirkungsspektrum.
Beispielsweise besitzt TNF inhibierende oder cytotoxische
Wirkung auf eine Reihe von Tumorzell-Linien [2,3],
stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und die
25 phagozytierende/cytotoxische Aktivität von myeloischen
Zellen [4,5,6], induziert Adhäsionsmoleküle in
Endothelzellen oder übt eine inhibierende Wirkung auf
Endothel aus [7,8,9,10], inhibiert die Synthese von
spezifischen Enzymen in Adipozyten [11] und induziert die
30 Expression von Histokompatibilitätsantigenen [12]. Manche
dieser TNF-Wirkungen werden über eine Induktion von anderen
Faktoren oder durch synergistische Effekte mit anderen
Faktoren, wie beispielsweise Interferonen oder Interleukinen
erzielt [13-16].

35

AB/12.9.89

TNF ist bei einer Reihe von pathologischen Zuständen, beispielsweise Schockzuständen bei Meningococcen-Sepsis [17], bei der Entwicklung von Autoimmun-Glomerulonephritis bei Mäusen [18] oder bei cerebraler Malaria bei Mäusen [19] und beim Menschen [41] involviert. Ganz allgemein scheinen die toxischen Wirkungen von Endotoxin durch TNF vermittelt zu sein [20]. Weiterhin kann TNF wie Interleukin-1 Fieber auslösen [39]. Auf Grund der pleiotropen funktionellen Eigenschaften von TNF kann man annehmen, dass TNF in Wechselwirkung mit anderen Cytokinen bei einer ganzen Reihe weiterer pathologischer Zustände als Mediator von Immunantwort, Entzündung oder anderen Prozessen beteiligt ist.

Diese biologischen Effekte werden durch TNF über spezifische Rezeptoren vermittelt, wobei nach heutigem Wissensstand sowohl TNF α wie TNF β an die gleichen Rezeptoren binden [21]. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich in der Anzahl von TNF-Rezeptoren [22,23,24]. Solche ganz allgemein gesprochen TNF-bindenden Proteine (TNF-BP) wurden durch kovalente Bindung an radioaktiv markiertes TNF nachgewiesen [24-29], wobei die folgenden scheinbaren Molekulargewichte der erhaltenen TNF/TNF-BP-Komplexe ermittelt wurden: 95/100 kD und 75 kD [24], 95 kD und 75 kD [25], 138 kD, 90 kD, 75 kD und 54 kD [26], 100 \pm 5 kD [27], 97 kD und 70 kD [28] und 145 kD [29]. Mittels anti-TNF-Antikörper-Immunoaffinitätschromatographie und präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ein solcher TNF/TNF-BP-Komplex isoliert werden [27]. Die reduktive Spaltung dieses Komplexes und anschliessende SDS-PAGE-Analyse ergab mehrere Banden, die allerdings nicht auf TNF-Bindeaktivität getestet wurden. Da die spezifischen Bedingungen, die zu der Spaltung des Komplexes verwendet werden müssen, zur Inaktivierung des Bindeproteins führen [31], ist letzteres auch nicht möglich gewesen. Die Anreicherung von löslichen TNF-BP aus dem humanen Serum oder Urin mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und

Gelfiltration (Molekulargewichte im Bereich von 50 kD) wurde von Olssen et al. beschrieben [30].

- Brockhaus et al. [32] erhielten durch
- 5 TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC aus Membranextrakten von HL60-Zellen eine angereicherte TNF-BP-Präparation, die wiederum als Antigenpräparation zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen TNF-BP verwendet wurde. Unter Verwendung eines solchen
 - 10 immobilisierten Antikörpers (Immunaффinitätschromatographie) wurde mittels TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie und HPLC von Loetscher und Brockhaus [31] aus einem Membranextrakt von humaner Placenta eine angereicherte Präparation von TNF-BP erhalten, die in der
 - 15 SDS-PAGE-Analyse eine starke breite Bande bei 35 kD, eine schwache Bande bei etwa 40 kD und eine sehr schwache Bande im Bereich zwischen 55 kD und 60 kD ergab. Im übrigen zeigte das Gel im Bereich von 33 kD bis 40 kD einen Proteinuntergrundschmier. Die Bedeutung der so erhaltenen
 - 20 Proteinbanden war jedoch im Hinblick auf die Heterogenität des verwendeten Ausgangsmaterials (Placenta-Gewebe; vereinigt Material aus mehreren Placenten) nicht klar.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nichtlösliche
- 25 Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden (TNF-BP), in homogener Form, sowie deren physiologisch verträgliche Salze. Bevorzugt sind solche Proteine, die gemäss SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen durch scheinbare Molekulargewichte von etwa 55
 - 30 kD, 51 kD, 38 kD, 36 kD und 34 kD bzw. 75 kD und 65 kD charakterisiert sind, insbesondere solche mit etwa 55 kD und 75 kD. Weiterhin bevorzugt sind solche Proteine, die durch wenigstens eine der beiden Aminosäureteilsequenzen gekennzeichnet sind:

- 35 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly

(II)

- 5 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht
 eindeutig bestimmt werden konnte.

 Im Stand der Technik sind bereits TNF-BP durch eine
N-terminale Teilsequenz charakterisiert worden [Europäische
10 Patentanmeldung mit der Publikations-Nr. 308 378], wobei
sich diese Sequenz von der erfindungsgemässen N-terminalen
Teilsequenz gemäss Formel (I) unterscheidet. Im übrigen
handelt es sich aber bei den im Stand der Technik
beschriebenen TNF-Bindeproteinen um aus dem Urin isolierte,
15 lösliche, d.h. nicht membrangebundene, TNF-BP und nicht um
membrangebundene, d.h. unlösliche, TNF-BP.

 Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch
Verfahren zur Isolierung der erfindungsgemässen TNF-BP.
20 Diese Verfahren sind dadurch charakterisiert, dass man im
wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander
ausführt: Herstellung eines Zell- oder Gewebeextraktes,
Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache
Ligandaффinitätschromatographie, hochauflösende
25 Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und präparative
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die
Kombination der aus dem Stand der Technik bekannten
einzelnen Reinigungsschritte ist für den Erfolg des
erfindungsgemässen Verfahrens essentiell, wobei einzelne
30 Schritte im Rahmen der zu lösenden Aufgabe modifiziert/
verbessert wurden. So wurde beispielsweise der ursprünglich
für die Anreicherung von TNF-BP aus humaner Placenta [31]
verwendete kombinierte Immunaффinitätschromatographie/
TNF α -Ligandaффinitätschromatographie-Schritt dadurch
35 abgeändert, dass eine BSA-Sepharose 4B-Vorsäule verwendet
wurde. Diese Vorsäule wurde zum Auftrag des Zell- oder
Membranextraktes in Reihe mit der Immunaффinitätssäule und
gefolgt von der Ligandaффinitätssäule geschaltet. Nach

Auftrag des Extraktes wurden die beiden zuletztgenannten Säulen abgekoppelt, jede für sich eluiert und die TNF-BP-aktiven Fraktionen wurden nochmals über eine Ligandenaffinitätssäule gereinigt. Erfindungswesentlich für die Durchführung des Umkehrphasen-HPLC-Schrittes ist die Verwendung eines Detergens-haltigen Lösungsmittelgemisches.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate, die wenigstens eines dieser TNF-BP oder Fragmente davon, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.

Die vorliegende Erfindung betrifft schliesslich die Verwendung solcher TNF-BP einerseits zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. andererseits zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, in deren Verlauf TNF involviert ist.

20

Ausgangsmaterial für die erfindungsgemässen TNF-BP sind ganz allgemein Zellen, die solche TNF-BP in membrangebundener Form enthalten und die dem Fachmann ohne Beschränkungen allgemein zugänglich sind, wie beispielsweise HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] und HEP2-Zellen [ATCC Nr. CCL 23]. Diese Zellen können nach bekannten Methoden des Standes der Technik kultiviert werden [40]. TNF-BP können dann nach bekannten Methoden des Standes der Technik mittels geeigneter Detergenzien, beispielsweise Triton X-114, 1-O-n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid), oder 3-[(3-Cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS), im besonderen mittels Triton X-100, aus den aus dem Medium abzentrifugierten und gewaschenen Zellen extrahiert werden. Zum Nachweis solcher TNF-BP können die üblicherweise verwendeten Nachweismethoden für TNF-BP, beispielsweise eine Polyethylenglykol-induzierte Fällung des ¹²⁵I-TNF/TNF-BP-

- Komplexes [27], im besonderen Filterbindungstests mit radioaktiv markiertem TNF gemäss Beispiel 1, verwendet werden. Zur Gewinnung der erfindungsgemässen TNF-BP können die generell zur Reinigung von Proteinen, insbesondere von
- 5 Membranproteinen, verwendeten Methoden des Standes der Technik, wie beispielsweise Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE verwendet werden. Besonders bevorzugte Methoden zur Herstellung erfindungsgemässer TNF-BP sind
- 10 Affinitätschromatographie, insbesondere mit TNF- α als Liganden und Immunaaffinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE. Die Elution von mittels SDS-PAGE aufgetrennten TNF-BP Banden kann nach bekannten Methoden der Proteinchemie erfolgen, beispielsweise mittels Elektroelution nach
- 15 Hunkapiller et al. [34], wobei nach heutigem Stand des Wissens die dort angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.
- 20 Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder enzymatische wie chemische Peptidspaltung charakterisiert werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene
- 25 Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP identifiziert werden und sind ebenfalls Gegenstand der
- 30 vorliegenden Erfindung.

- Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenzinformation können unter Beachtung der Degeneration des genetischen Codes nach im Stand der Technik
- 35 bekannten Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51]. Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder

genomische DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, abgesucht werden.

DNA-Stücke solcher Sequenzen können dann wiederum nach bekannten Methoden sequenziert oder in geeigneten

- 5 Expressionsvektoren zur Expression in dazu passenden Wirtszellen gebracht werden. Die so erhaltenen TNF-BP können dann nach gängigen Methoden des Standes der Technik aus den Wirtszellen selbst isoliert werden. Ausserdem können mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Fragmente
- 10 kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden, relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und in ihrer Komplementarität geeignete Oligonucleotide als "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen
- 15 beiden Sequenzen liegende Fragment identifiziert und amplifiziert wird. Die Bestimmung der Basensequenz eines derartigen Fragmentes ermöglicht eine unabhängige Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments für das es kodiert.

20

Die erfindungsgemäss erhaltenen TNF-BP können auch als Antigene zur Erzeugung von poly- und monoklonalen Antikörpern nach bekannten Methoden der Technik [44,45] oder gemäss dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren verwendet

- 25 werden. Solche Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper gegen die 75 kD-TNF-BP-Spezies, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

- 30 Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF (K_d -Werte um 10^{-10} M) können diese oder Fragmente davon als Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-
- 35 Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

Im übrigen können erfindungsgemässe TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von TNF-Agonisten so wie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

5

Die erfindungsgemässen TNF-BP sowie deren physiologisch verträgliche Salze können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforderlich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präparaten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.

20

Nachdem die Erfindung vorstehend allgemein beschrieben worden ist, sollen die folgenden Beispiele Einzelheiten der Erfindung veranschaulichen, ohne dass diese dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt wird.

25

Beispiel 1

Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radiojodiertem ¹²⁵I-TNF nachgewiesen. TNF (46,47) wurde mit Na¹²⁵I (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv makiert. Zum Nachweis der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45 µ, BioRad, Richmond,

- California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend mit $5 \cdot 10^5$ cpm/ml ^{125}I -TNF α ($0.3-1.0 \cdot 10^8$ cpm/ μg) in zwei Ansätzen mit und ohne
- 5 Beigabe von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht-markiertem TNF α inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem γ -Counter gezählt. Die spezifische
- 10 ^{125}I -TNF-Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein K_d -Wert von $\sim 10^{-9}-10^{-10}$ M ermittelt wurde.

15

Beispiel 2

Zellextrakte von HL-60-Zellen

- 20 HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l NaHCO_3 und 5% fötales Kälberserum enthielt in einer 5%-igen CO_2 -Atmosphäre kultiviert, zentrifugiert und mit isotonem Phosphatpuffer (PBS; 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l
- 25 KH_2PO_4 , 8.0 g/l NaCl, 2.16 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 μM Leupeptin, 1 μM Pepstatin, 1 mM o-Phenanthrolin, 5 mM Jodacetamid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt war (im folgenden als
- 30 PBS-M bezeichnet), gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von $2.5 \cdot 10^8$ Zellen/ml in PBS-M mit Triton X-100 (Endkonzentration 1.0%) extrahiert. Der Zellextrakt wurde durch Zentrifugation geklärt (15'000 x g, 1 Stunde; 100'000 x g, 1 Stunde).

Beispiel 3Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

5 Der gemäss Beispiel 2 erhaltene Zentrifugationsüberstand
wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der verdünnte
Überstand wurde bei 4°C auf eine Säule aufgetragen
(Flussrate: 0.2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 enthielt (Bio
Rad Katalog Nr. 153-6099) an das 20 mg rekombinantes humanes
10 TNF- α [Pennica, D. et al. (1984) Nature 312, 724; Shirai,
T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985)
Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen des Herstellers
gekoppelt worden war. Die Säule wurde bei 4°C und einer
Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml PBS, das 0.1%
15 Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS gewaschen. So
angereichertes TNF-BP wurde bei 22°C und einer Flussrate von
2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2.8, 0.1% Decylmaltosid
eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30 Einheit
[Amicon] auf 10 μ l konzentriert.

20

10 μ l dieses Eluates wurden mit 20 μ l vollständigem
Freundschen Adjuvans gemischt. 10 μ l der Emulsion wurden
gemäss dem von Holmdahl, R. et al. [(1985), J. Immunol.
Methods 83, 379] beschriebenen Verfahren an den Tagen 0, 7
25 und 12 in eine hintere Fusspfote einer narkotisierten
Balb/c-Maus injiziert.

Am Tag 14 wurde die immunisierte Maus getötet und der
popliteale Lymphknoten herausgenommen, zerkleinert und in
30 Iscove's Medium (IMEM, GIBCO Katalog Nr. 074-2200), das
2 g/l NaHCO₃ enthielt, durch wiederholtes Pipettieren
suspendiert. Gemäss einem modifizierten Verfahren von De
St.Groth und Scheidegger [J. Immunol. Methods (1980), 35, 1]
wurden 5×10^7 Zellen des Lymphknotens mit 5×10^7 PAI Maus-
35 Myelomazellen (J.W. Stocker et al., Research Disclosure,
217, Mai 1982, 155-157), die sich in logarithmischem
Wachstum befanden, fusioniert. Die Zellen wurden gemischt,

durch Zentrifugation gesammelt und durch leichtes Schütteln
in 2 ml 50% (v/v) Polyethylenglycol in IMEM bei
Raumtemperatur resuspendiert und durch langsame Zugabe von
10 ml IMEM während 10 Minuten vorsichtigen Schüttelns
5 verdünnt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt
und in 200 ml vollständigem Medium [IMEM + 20% fötales
Kälberserum, Glutamin (2.0 mM), 2-Mercaptoethanol
(100 µM), 100 µM Hypoxanthine, 0.4 µM Aminopterin und
16 µM Thymidine (HAT)] resuspendiert. Die Suspension wurde
10 auf 10 Gewebekulturschalen, die jeweils 96 Vertiefungen
enthielten, verteilt und ohne Wechsel des Mediums bei 37°C
in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit
von 98% 11 Tage lang inkubiert.

15 Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende
Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen sowie durch ihre
Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Beispiel 1.

Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti-
20 (TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren.
5x10⁶ HL60-Zellen oder U937-Zellen wurden in vollständigem
RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten
monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder
Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP
25 gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von
1 ng/ml bis 10 µg/ml inkubiert. Nach einer Stunde
Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation
gesammelt und mit 4.5 ml PBS bei 0°C gewaschen. Sie wurden
in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium (Beispiel 2), das
30 zusätzlich 0.1% Natriumazid und ¹²⁵I-TNF (10⁶ cpm/ml)
(s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische
Radioaktivität betrug 700 Ci/mmol. Die Zellen wurden
2 Stunden bei 4°C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4.5 ml
PBS das 1% BSA und 0.001% Triton X 100 (Fluka) enthielt bei
35 0°C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität
wurde in einem γ-Scintillationszähler gemessen. In einem
vergleichbaren Experiment wurde die zellgebundene

Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/5x10⁶ Zellen).

5

Beispiel 4Affinitätschromatographie

- Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss
- 10 Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNF α (3,0 mg/ml Gel) und Rinderserumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der
- 15 gemäss Beispiel 2 erhaltene Zellextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet:
- BSA-Sepharose-Vorsäule, Immunaффinitätssäule [Anti-(TNF-BP)-Antikörper], TNF α -Ligand-Aффinitätssäule.
- 20 Nach vollständigem Auftrag wurden die beiden letztgenannten Säulen abgetrennt und einzeln für sich mit je 100 ml der folgenden Pufferlösungen gewaschen: (1) PBS, 1.0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; (2) PBS, 0.1% Triton X-100, 0.5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin,
- 25 100 E/ml Aprotinin; und (3) PBS, 0.1% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin. Sowohl die Immun- als auch die TNF α -Ligand-Aффinitätssäule wurden dann mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0.2% Decylmaltoside, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin jede für sich eluiert. Die im
- 30 Filtertest gemäss Beispiel 1 aktiven Fraktionen jeder Säule wurden danach jeweils vereint und mit 1M Tris pH 8.0 neutralisiert.

- Die so vereinten TNF-BP-aktiven Fraktionen der
- 35 Immun-Aффinitätschromatographie einerseits und der TNF α -Ligand-Aффinitätschromatographie andererseits wurden zur weiteren Reinigung nochmals auf je eine kleine

TNF α -Ligand-Affinitätssäule aufgetragen. Danach wurden diese beiden Säulen mit je 40 ml von (1) PBS, 1.0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (2) PBS, 0.1% Triton X-100, 0.5M NaCl, 10 mM ATP, 10mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (3) PBS, 0.1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 1.0% Desoxycholat, 0.1% SDS, (5) PBS, 0.2% Decylmaltosid gewaschen. Anschliessend wurden die Säulen mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0.2% Decylmaltosid eluiert. Fraktionen von 0.5 ml von jeder Säule wurden für sich gesammelt und die gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen von jeder Säule jeweils für sich vereint und in einer Centricon-Einheit (Amicon, Molekulargewichts-Ausschluss 10'000) aufkonzentriert.

15

Beispiel 5

Auftrennung mittels HPLC

Die gemäss Beispiel 4 erhaltenen aktiven Fraktionen wurden gemäss ihrer unterschiedlichen Herkunft (Immun- bzw. Ligand-Affinitätschromatographie) jeweils für sich auf C1/C8 Umkehrphasen-HPLC-Säulen (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), die mit 0.1% Trifluoressigsäure, 0.1% Octylglucosid equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden dann mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (0-80%) im gleichen Puffer bei einem Fluss von 0.5 ml/min eluiert. Fraktionen von 1.0 ml wurden von jeder Säule gesammelt und die aktiven Fraktionen von jeder Säule für sich vereint (Nachweis gemäss Beispiel 1).

30

Beispiel 6

Auftrennung mittels SDS-PAGE

35

Die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gemäss

[34] weiter aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-Probenpuffer während 3 Minuten auf 95°C erhitzt und anschliessend auf einem 12% Acrylamid-Trenngel mit einem 5%igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz zur Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte auf dem SDS-PAGE Gel wurden die folgenden Eichproteine verwendet: Phosphorylase B (97.4 kD), BSA (66.2 kD), Ovalbumin (42.7 kD), Carboanhydrase (31.0 kD), Soya Trypsin-Inhibitor (21.5 kD) und Lysozym (14.4 kD).

10

Unter den genannten Bedingungen wurden für Proben, die gemäss Beispiel 4 durch TNF- α -Ligandenaffinitätschromatographie von Immunaффinitätschromatographieeluat erhalten und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zwei Banden von 55 kD und 51 kD sowie drei schwächere Banden von 38 kD, 36 kD und 34 kD erhalten. Diese Banden wurden in einem Mini Trans Blot System (BioRad, Richmond, California, USA) elektrophoretisch während 1 Stunde bei 100 V in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf eine PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA) transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit 0,15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) auf Protein gefärbt oder mit entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend zum Nachweis von Banden mit TNF-BP-Aktivität mit 125 I-TNF gemäss den in Beispiel 1 beschriebenen Filtertestbedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass alle in der Proteinfärbung zur Darstellung gelangten Banden spezifisch TNF α banden. Alle diese Banden banden im Western Blot nach Towbin et al. [38] auch den gemäss Beispiel 3 hergestellten monoklonalen Antikörper. Dabei wurde ein gemäss dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit Na 125 I radioaktiv markierter, affinitätsgereinigter (Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätssäule) Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper zum autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Proben, die gemäss Beispiel 4 durch zweimalige
TNF- α -Ligandenaffinitätschromatographie des Durchlaufs der
Immunaффinitätschromatographie erhalten und durch HPLC
gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zeigten
5 unter den oben spezifizierten SDS-PAGE- und
Blottransfer-Bedingungen zwei zusätzliche Banden von 75 kD
und 65 kD, die beide im Filtertest (Beispiel 1) spezifisch
TNF banden. Im Western Blot gemäss Towbin et al. (s.o.)
reagierten die Proteine dieser beiden Banden nicht mit dem
10 gemäss Beispiel 3 hergestellten Antikörper. Sie reagierten
allerdings mit einem monoklonalen Antikörper, der ausgehend
von der 75 kD-Bande erzeugt worden war.

Beispiel 7

15

Aminosäuresequenzanalyse

Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss
Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1)
20 aktiven Fraktionen mittels der in Beispiel 6 beschriebenen,
nun jedoch reduzierenden, SDS-PAGE Bedingungen
(SDS-Probenpuffer mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es
wurden die gleichen Banden wie gemäss Beispiel 6 gefunden,
die allerdings auf Grund der reduzierenden Bedingungen der
25 SDS-PAGE im Vergleich zu Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD
höhere Molekulargewichte zeigten. Diese Banden wurden dann
gemäss Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit
0.15% Serva-Blau in Methanol/Wasser/ Eisessig (50/40/10
Volumenteile) während 1 Minute gefärbt, mit
30 Methanol/Wasser/Eisessig (45/48/7 Volumenteile) entfärbt,
mit Wasser gespült, luftgetrocknet und danach
ausgeschnitten. Bei sämtlichen Schritten wurden zur
Vermeidung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller
[34] angegebenen Bedingungen eingehalten. So vorbereitete
35 Proben wurden dann in einem automatisierten
Gasphasen-Mikrosequenzier-Gerät (Applied Biosystems Modell
470A, ABI, Foster City, Calif., USA) mit einem on-line

nachgeschalteten automatisierten HPLC

PTH-Aminosäureanalysator (Applied Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt wurden:

5

1., Für die 55 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-
Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile,
wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht
bestimmt werden konnte.

10

2., Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäss
nichtreduzierender SDS-PAGE):
Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu

15

3., Für die 65 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
Bei der N-terminalen Sequenzierung der 65 kD Bande
wurden bis zum 15. Rest ohne Unterbrechung zwei
parallele Sequenzen ermittelt. Da eine der beiden
Sequenzen einer Teilsequenz des Ubiquitins [36,37]
entsprach, wurde für die 65 kD-Bande die folgende
Sequenz abgeleitet:

20

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly

25

wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht
bestimmt werden konnte.

Beispiel 8

30

Bestimmung von Basen-Sequenzen von komplementärer DNA (cDNA)

Ausgehend von der Aminosäuresequenz gemäss Formel I
wurden unter Berücksichtigung des genetischen Codes zu den
Aminosäureresten 2-7 und 17-23 entsprechende, vollständig
degenerierte Oligonucleotide in geeigneter Komplementarität
synthetisiert ("sense" and "antisense" Oligonucleotide).

35

Totale zelluläre RNA wurde aus HL60-Zellen isoliert [42, 43], und der erste cDNA-Strang durch Oligo-dT-Priming oder durch Priming mit dem "antisense" Oligonucleotid mittels eines cDNA-Synthese-Kits (RPN 1256, 5 Amersham, Amersham, England) gemäss der Anleitung des Herstellers synthetisiert. Dieser cDNA-Strang und die beiden synthetisierten degenerierten Oligonucleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA gemäss Anleitung des Herstellers) dazu 10 verwendet, die für die Aminosäure-Reste 8-16 (Formel I) codierende Basesequenz als cDNA-Fragment zu synthetisieren. Die Basensequenz dieses cDNA-Fragmentes lautet: 5'-AGGGAG-AAGAGAGATAGTGTGTGTCCC-3'.

15

20

25

30

35

Literatur

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray:
5 Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985
2. B. Beutler and A. Cerami: New England J. Med. 316, 379,
1987
3. L.J. Old: Science 230, 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M.
10 Murphy and B. Perussia: J. exp. Med. 164, 1206, 1986
5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C.
Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: J. exp.
Med. 163, 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari,
15 M.A. Palladino and H.M. Shepard: Science 230, 943, 1985
7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi,
Y. Mano and Y. Sawasaki: J. Natl. Cancer Inst. 76, 1113,
20 1986
9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: Am.
J. Pathol. 123, 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock,
T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick
25 and M.A. Gimbrone: J. Immunol. 138, 3319, 1987
11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: Proc.
Natl. Acad. Sci. USA 79, 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger and
J.S. Pober: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 446, 1986
- 30 13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: Nature 323, 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhnlein and W.C.
Greene: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore:
Cell 57, 287, 1989
- 35 16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 86, 1490, 1989

17. A. Waage, A. Halsteuren and T. Espevik: Lancet, Febr.
14, 1987, 355,
18. C.O. Jacob and H.O. McDevitt: Nature 331, 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piquet, B. Allet, P. Lambert
5 and P. Vassalli: Science 237, 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: Science 229,
869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: Nature 318,
665, 1985
- 10 22. M. Tsujimoto, Y.K. Yip and J. Vilcek: Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 82, 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers:
J. Biol. Chem. 260, 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon:
15 J. Biol. Chem., im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 82, 5756, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 84, 3293, 1987
- 20 27. G.B. Stauber, R.A. Aiyer and B.B. Aggarwal: J. Biol.
Chem. 263, 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: J.
Biochem. 105, 120, 1989
29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi,
25 M. Maeda and I. Urushizaki: J. Biol. Resp. Modifiers 7,
276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson,
C. Peetre and H. Thysell: Abstract, 2nd Intern.
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related
30 Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Lötscher and M. Brockhaus: Abstract, 2nd Intern.
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related
Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und
35 W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor
Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California,
15.-20. Januar 1989

33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in Biophysical Chemistry, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: Methods Enzymol. 91, 227, 1983
- 5 35. U.K. Lämmler: Nature 227, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 823, 1986
- 10 38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in Lymphokines, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
- 15 40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: Handbook of Cell and Organ Culture, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: New Engl. J. Med. 320, 1586, 1989
- 20 42. T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982
43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988, S. Wiley and Sons, New York, 1987
- 25 44. E. Harlow and D. Lane: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
- 30 45. S. Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: J. Immunol. Methods 35, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987
- 35

N 31.08.90

- 21 -

47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der Heyden, R. Muller, M. Ruysschaert, A. van Vliet, R. Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London
- 5 48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849, 1987
49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61, 1988
50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr. 10 473, 71, 1989
51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985

15

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nicht-
lösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form,
5 sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

2. Proteine gemäss Anspruch 1, die durch
Molekulargewichte gemäss SDS-PAGE unter nichtreduzierenden
Bedingungen von etwa 55 kD und 75 kD charakterisiert sind.

10 3. Proteine gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, die
wenigstens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthalten:

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-
15 Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile

(I)

bzw.

20 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-
Gly, (II)

wobei X für einen nicht bestimmten Aminosäurerest steht.

4. Ein Verfahren zur Isolierung eines Proteins gemäss
25 einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass man im
wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander
ausführt: Herstellung eines Zellextraktes,
Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache
Ligandaффinitätschromatographie, HPLC und präparative
30 SDS-PAGE.

5. Pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet,
dass sie eine oder mehrere Verbindung(en) gemäss einem der
Ansprüche 1-3, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren
35 pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen,
inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien
enthalten.

N 31.08.90

- 23 -

6. Verwendung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, bei denen TNF involviert ist.

5

7. Gegen ein Protein gemäss Ansprüche 1-3 gerichtete Antikörper.

10

15

20

25

30

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.